云 南 植 物 研 究　2002，**24**（4）：515～520
Acta Botanica Yunnanica

播娘蒿下胚轴高频率再生植株因素的研究*

周颂东[1]，**罗　鹏**[2]

（1 四川师范学院生物系，四川 南充　637002；2 四川大学生命科学学院植物研究所，四川 成都　610064）

摘要：以播娘蒿（*Descurainia sophia*）下胚轴为外植体，研究影响其分化的若干因素。结果表明：用附加 2，4－D 的培养基，对下胚轴切段预培养 5 d 可提高分化频率；1.7 mg/L $AgNO_3$ 对分化出芽有很大促进作用，最佳激素组合为 2.0 mg/L 6－BA＋0.2 mg/L NAA；黄化苗的下胚轴比绿苗的下胚轴对激素反应更敏感，最高分化频率可达 86.05%。再生芽转至 1/2 MS＋0.5 mg/L NAA＋0.5 mg/L IBA 的培养基中，生根率 100%。

关键词：播娘蒿；下胚轴；再生植株；影响因素

中图分类号：Q 945.39　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0253－2700(2002)04－0515－06

Studies on Factor of High Rate Regeneration Plant of *Descurainia sophia* Hypocotyl

ZHOU Song-Dong[1]，LUO Peng[2]

（1 *Department of Biology*，*Sichuan Teachers College*，Nanchong 637002，China；
2 *Botanical Institute*，*Sichuan University*，Chengdu 610064，China）

Abstact：The hypocotyl of *D. sophia* was cultured to study the effect of some factors on the rate of bud regeneration. The results showed that the rate of hypocotyl differentiating was improved via a preculture of five-day period with the medium containing 2，4－D；$AgNO_3$ （1.7 mg/L） could greatly improve the differentiating rate of hypocotyl；the best hormone combination was 2.0 mg/L 6－BA＋0.2 mg/L NAA when 1.7 mg/L $AgNO_3$ was added to this medium；the hypocotyl of yellow seedlings was more sensitive to hormone than that of green seedlings，its differentiating rate could reach as high as 86.05%。When the regeneration buds were transferred 1/2 MS＋0.5 mg/L NAA＋0.5 mg/L IBA，the rate of regeneration roots reached 100%.

Key words：*Descurainia sophia*；Hypocotyl；Regeneration plant；Influential factors

播娘蒿（*Descurainia sophia*（L.） Webb. ex Prantl）属十字花科播娘蒿属，是四川大学植物研究所筛选出来的，一种极具开发潜力的特种油料作物（罗鹏等，1993）。从播娘蒿组培已有的报道可知（高福利等，1997；周颂东等，1999），其再生途径为外植体完全脱分化形成愈伤组织，再从愈伤组织分化出芽，但该途径较繁琐，种质易产生变异，再生频

---

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670084）
收稿日期：2001－08－20，2001－12－05 接受发表
作者简介：周颂东（1972－）女，硕士，讲师，主要从事植物生理、遗传的教学和科研工作。

率不高。而用于珍贵种质的快繁以及遗传转化的再生系统应是：再生周期短、再生率高、易操作、培养程序简单，能保持原种特性。因此本实验以播娘蒿下胚轴为外植体，对影响它分化的若干因素进行了研究，旨在建立高频率植株再生体系，筛选出再生能力强的培养方法，为基因转化、体细胞无性系变异的利用、突变体筛选以及品种的改良研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采自四川红原草原所，室温袋装保存于四川大学植物研究所的播娘蒿种子，经常规消毒，接种于 MS 培养基，所得无菌苗的下胚轴为外植体。

1.2 实验方法

1.2.1 **外植体的获得** 将种子用 70% 乙醇浸泡 1 min，无菌水冲洗一次，转入 0.1% $HgCl_2$ 溶液中消毒 6 ~ 8 min，随即用无菌水冲洗 5 次，接种到无激素的 MS 固体培养基上，培养 7 ~ 10 d，选取长势良好的无菌苗，切取其下胚轴为外植体。

1.2.2 将下胚轴切为 0.5 cm 长的切段，接种在 1.5 mg/L NAA 或者 1.0 mg/L 2，4 – D 分别组合 0.2 mg/L 6 – BA 的 MS 培养基中，预培养 2 ~ 10 d 之后，转接到附加 2.0 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L NAA 的 MS 分化培养基中培养；用于对照的外植体直接接种在分化培养基中培养。

1.2.3 将下胚轴切段，接种在含不同浓度 $AgNO_3$ 的 MS 培养基中（附加 2.0 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L NAA）培养。

1.2.4 将下胚轴切段，接种在含不同浓度的 6 – BA，NAA 相组合的 MS 培养基中（附加 1.7 mg/L $AgNO_3$）培养。

1.2.5 分别将黄化苗和绿苗的下胚轴切段，接种在附加不同浓度的 6 – BA，NAA 相组合的 MS 培养基中（附加 1.7 mg/L $AgNO_3$）培养。

1.2.6 **生根培养** 将再生芽移至 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA 的生根培养基中诱导生根。

培养条件：培养基中附加 30 g/L 蔗糖，7 g/L 琼脂，pH5.6 ~ 5.8，25 ± 2℃，除黄化苗用暗培养外，其余均为光照强度 1 500 lx，光照时间 12 ~ 14 h/d。分化（再生）频率 = 出芽个数/外植体总数。培养 60 d 时，统计分化频率。

2 结果与分析

2.1 预培养对播娘蒿下胚轴分化的影响

接种在含 2，4 – D 的培养基中的下胚轴切段，经过一段时间预培养后转入分化培养基培养，其分化频率均高于仅在分化培养基中培养的处理。而接种在含 NAA 的培养基中预培养的下胚轴切段，其分化频率与对照差异不明显。由此可见：不同预培养基对诱导下胚轴再生芽的作用不同，2，4 – D 的作用优于 NAA。当切段在附加 1.0 mg/L 2，4 – D 的预培养基中培养 5 d 后，转入分化培养基中培养约 30 d 开始分化芽，60 d 时分化频率达 53.13%，而预培养 2 d 和 10 d 以及没有预培养的对照，再生芽分化略迟，分化频率分别为 40.63%、31.25% 和 28.26%。可见预培养时间的长短对分化频率也有很大影响。结果表明，在附加 1.0 mg/L 2，4 – D 的预培养基中培养 5 d，对播娘蒿下胚轴分化出芽的促进作用最强（表 1）。

2.2 $AgNO_3$ 对播娘蒿下胚轴培养的影响

$AgNO_3$ 从 0 mg/L ~ 5.1 mg/L，愈伤组织诱导率均为 100%（表 2），但是愈伤组织生长速度，质地状况却因浓度不同而不同。1、2 号培养基中的下胚轴切段 7 d 可见切口处膨大（图 1：1），而 3、4 号中的 12 d 时才可见膨大；在生长过程中，1、2 号的愈伤组织生长快

表 1　预培养的激素组合和预培养时间对播娘蒿下胚轴分化的影响

Table 1　Effect of hormone combimation and time of preculture on differentiation of *D. sophia* hypocotyl

激素浓度/mgL^{-1} Hormone concentration			预培养时间/d Time of perculture	拉种数/个 No. of explants inoculated	分化频率/% Differentiation rate
2，4 – D	NAA	6 – BA			
0	0	0	0	46	28.26
1.0	0	0.2	2	32	40.63
			5	32	53.13
			10	48	31.25
0	1.5	0.2	2	32	34.38
			5	32	25.00
			10	32	15.63

（图 1：2），3 号生长较慢，4 号生长慢，可见 $AgNO_3$ 对愈伤组织的生长具有抑制作用；从愈伤组织的状况来看，随 $AgNO_3$ 浓度的增加，愈伤组织的硬度增加，趋致密。$AgNO_3$ 浓度对下胚轴分化频率和再生芽的生长状况影响很明显，当 $AgNO_3$ 浓度为 1.7 mg/L 时，作用最强，分化频率可达 74.00%，再生芽状况好；当 $AgNO_3$ 浓度继续增加时，分化频率却随之降低，而且再生芽状况也随之降低；当 $AgNO_3$ 浓度为 5.1 mg/L 时，再生芽矮小，叶片深绿，似玻璃化状态。

表 2　不同浓度 $AgNO_3$ 对播娘蒿下胚轴培养的影响

Table 2　Effect of different $AgNO_3$ concentration on culture of *D. sophia* hypocotyl

培养基 Medi-umAg	$AgNO_3$ 浓度 /mgL^{-1}	接种数/个 No. of explants inoculated	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus	愈伤组织生长速率 Growth rate of callus	愈伤组织生长状况 Growth of callus	分化频率 /% Differentiation rate	再生芽状况 /cm Growth of regeneration buds
1	0	46	100	快 Fast	白色，较致密 White，comparatively fine and close	28.26	≈1.0
2	1.7	50	100	快 Fast	绿白色，致密 Green and white fine and close	74.00	>1.5
3	3.4	48	100	较慢 Comparatively slow	白色，很致密 White，more fine and close	31.25	<1.0
4	5.1	32	100	慢 Slow	白色，特致密 White，most fine and close	15.63	<0.5

2.3　激素浓度对播娘蒿下胚轴培养的影响

不同浓度的 6 – BA、NAA 对下胚轴分化频率影响较大（表 3）。在 1.7 mg/L $AgNO_3$ 作用下，NAA 为 0 mg/L 时，单独 6 – BA 作用，无论其浓度大小，愈伤组织诱导率均为 0%，也无下胚轴分化出芽。当 6 – BA 与 NAA 协同作用时，对播娘蒿下胚轴的愈伤组织形成和分化出芽具较强的促进作用（表 3）。结果表明：在 6 – BA 浓度一定时，NAA 浓度为 0.2 mg/L 时，对芽的诱导效率比 0.5 mg/L 高，同时可见，在 NAA 为 0.2 mg/L，6 – BA 为 2.0 mg/L 时，芽的分化频率可达 74.42%。在 60 d 统计时，2.0 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L NAA 相

表 3 激素浓度对播娘蒿下胚轴培养的影响

Table 3 Effect of hormone rate on culture of *D. sophia* hypocotyl

激素浓度/mgL^{-1} Hormone concentration		接种数/个 No. of explants inoculated	愈伤组织诱导率/% Percentage of callus	分化频率/% Differentiation rate	繁殖系数/个 Breeding rate
6-BA	NAA				
1.0	0	42	0	0	0
2.0	0	45	0	0	0
3.0	0	44	0	0	0
4.0	0	46	0	0	0
1.0	0.2	41	100	51.22	1~2
2.0	0.2	43	100	74.42	1~3
3.0	0.2	43	100	48.84	1~4
4.0	0.2	43	100	41.86	1~4
1.0	0.5	38	100	15.79	1
2.0	0.5	41	100	73.17	1~2
3.0	0.5	43	100	46.51	1~3
4.0	0.5	42	100	40.47	1~4

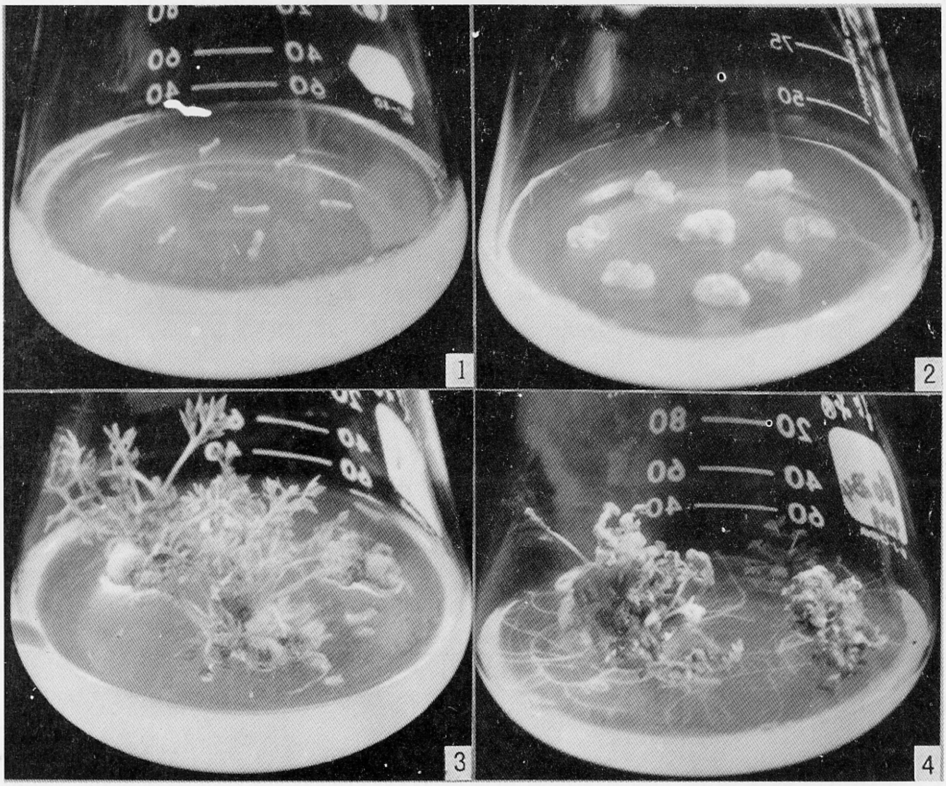

图 1 播娘蒿下胚轴的组织培养

1. 培养 10 d 的下胚轴 2. 培养 30 d 的愈伤组织 3. 再生芽 4. 再生植株

Fig.1 Tissue culture of *D. sophia* hypocotyls

1. Hypocotyl cultured for ten days 2. Hypocotyl cultured for thirty days 3. Regeneration bud 4. Regeneration plant

组合的培养基中，再生芽高度均大于 1.5 cm（图 1：3）；而 4.0 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L 组合的再生芽高度在 0.5 – 1.0 cm 之间，似玻璃化状态。

2.4　不同培养方式来源的播娘蒿下胚轴分化频率的比较

不同来源的下胚轴对激素浓度的反应不同，分化频率的高低也不同（表 4）。由种子暗培养而来的黄化苗下胚轴，在 6 – BA 浓度从 1.0 mg/L 增加到 2.0 mg/L 时，分化频率明显增加；当 6 – BA 浓度从 3.0 mg/L 增加到 4.0 mg/L 时，分化频率又明显降低，这表明其对 6 – BA 浓度变化较敏感。在附加 1.7 mg/L $AgNO_3$、2.0 mg/L 6 – BA 和 0.2 mg/L NAA 的培养基中培养，黄化苗下胚轴分化频率高达 86.05%，比绿苗下胚轴分化频率约高 12%。可见在这一适宜培养基中，采用黄化苗下胚轴较为合适。

表 4　黄化苗与绿苗下胚轴分化频率比较

Table 4　Compare differentiation rate of yellow shoots with green shoots

激素浓度/mgL^{-1} Hormone concentration		绿苗 green shoots		黄化苗 yellow shoots	
		接种数/个	分化频率/%	接种数/个	分化频率/%
6-BA	NAA	No. of explantsinoculated	Differentiation rate	No. of explants inoculated	Differentiation rate
1.0	0.2	41	51.22	44	31.82
2.0	0.2	43	74.42	43	86.05
3.0	0.2	43	48.84	43	65.12
4.0	0.2	43	41.86	40	25.00

2.5　生根培养

将再生芽转入 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA 的生根培养基中，结果表明：10 d 左右开始形成突起的不定根，20 d 左右再生芽基部长出白色根，根多且较粗，分枝也多（图 1：4）。

3　讨论

3.1　预培养对分化的影响

实验 2.1 结果表明，不同预培养基，预培养不同的时间，对分化频率均有影响。2，4 – D 表现出对芽器官发生具有较强的启动作用。Williams 等（1990）在培养甘蓝下胚轴时，在分化培养基中附加低浓度 2，4 – D 取得了很好的效果。Yang 等（1991）在埃塞俄比亚芥下胚轴的培养中也得到了类似结果。本实验中，预培养基附加 NAA 对下胚轴分化频率的提高效应不明显，而 2，4 – D 表现出较强的作用。

3.2　$AgNO_3$ 对分化的影响

一般认为（石淑稳等，1998）$AgNO_3$ 促进细胞分化的机理是：植物组织和细胞在离体培养时易产生乙烯，其对细胞生长有毒害作用，培养基中加 $AgNO_3$ 可有效地抑制乙烯的形成，从而减少或清除乙烯对细胞生长的不利影响，提高细胞再生能力。

但 $AgNO_3$ 的浓度是否也影响分化频率呢？实验 2.2 结果表明 $AgNO_3$ 的浓度对播娘蒿下胚轴愈伤组织的生长，分化均有较大影响，对再生芽的状况也有影响。对于播娘蒿下胚轴的分化，适宜的 $AgNO_3$ 浓度为 1.7 mg/L，这与王景雪等（1997）在油菜下胚轴培养中所用的浓度一致。但石淑稳等（1998）在甘蓝型油菜 750b 品系下胚轴再生分化研究中，观察

到附加 6.0 mg/L $AgNO_3$ 再生芽率较对照提高 40.1%。这些结果显示，$AgNO_3$ 的浓度对分化频率有影响，而且不同基因型的下胚轴对 $AgNO_3$ 浓度的需求不尽相同，每一种外植体可能都存在一个适宜的 $AgNO_3$ 浓度值。

3.3 外植体对分化的影响

许多研究表明（程林海等，1998；高福利等，1997；周冀明，1993），下胚轴通常比其它部位的器官分化频率高，我们在研究中也发现，播娘蒿下胚轴这一特点尤为明显，具较强的分化频率（周颂东，1999）。

但同一基因型的下胚轴由于来源时培养方式的不同，对分化频率的影响也不相同。本实验中，黄化苗的下胚轴与绿苗的下胚轴对激素浓度反应不同，分化频率也不同，这可能是培养时的光质影响了下胚轴内源激素的分布和数量，其机理有待进一步探讨。因此要获得高频率再生植株，选择具较强分化能力的外植体及注意其来源至关重要。

综上所述，在播娘蒿组织培养中，理想的外植体为黄化苗下胚轴。操作过程中，可以直接用 MS + 2.0 mg/L 6 – BA + 0.2 mg/L NAA + 1.7 mg/L $AgNO_3$ 分化培养基培养，一次成苗，分化频率可达 86.05%。此方法操作简便、快捷，诱导率高，因而可作为播娘蒿组织培养的一种行之有效的途径。据贾士荣等（1992）报道，作为好的遗传操作系统，要求其组织培养的再生频率至少应在 80% ~ 90% 以上，且每块外植体上必须再生丛生芽。本研究已基本达到这一要求。

〔参 考 文 献〕

Cheng LM（程林海），Sun Y（孙毅），Liu SX（刘少翔），*et al*，1998. Study on the regeneration of various explants of *Soybean*［J］. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*（中国油料作物学报），**20**（2）：21—24

Gao FL（高福利），Gao HB（高宏波），Luo P（罗鹏），*et al*，1997. Tissue culture and plantlet regeneration of *Descurainia sophia*［J］. *Plant Physiology Communications*（植物生理学通讯），**33**（5）：357

Jia SR（贾士荣），Cao DS（曹冬孙），1992. Transgenic plants［J］. *Chinese Bulletin of Botany*（植物学通报），**9**（2）：3—15

Luo P（罗鹏），Zhang ZQ（张兆清），Yang Y（杨毅），*et al*，1993. Study and utilization of the Cruciferous oil plant resource of the grassland of west Sichuan［J］. *Journal of Nature Resource*（自然资源学报），**8**（3）：281—285

Shi SW（石淑稳），Zhou YM（周永明），1998. High frequency of shoot regeneration from hypocotyls explants in *Brassic napus* L［J］. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*（中国油料作物学报），**20**（2）：1—6

Wang JX（王景雪），Sun Y（孙毅），Liu SX（刘少翔），*et al*，1997. Influential factors for high frequency plant regeneration from mustsrd Hypocotyl［J］. *Acta Agronomica Sinica*（作物学报），**23**（3）：376—379

Zhou JM（周冀明），1993. Genetic transformation of *Orychophragmus violaceus*［D］. Doctor's degree thesis of Sichuan University（四川大学博士学位论文）

Zhou SD（周颂东），1999. Studies on the plant genetic resource *Descurainia sophia*［D］. Master's degree thesis of Sichuan University（四川大学硕士学位论文）

Zhou SD（周颂东），Luo P（罗鹏），Bai ZQ（柏正强），1999. Studies on tissue culture and plantlet regeneration of tiny buds and floral axes of *Descurainia sophia*［J］. *Journal of Sichuan Grassland*（四川草原），**2**：37—38

Williams J，Pink DC，Biddington NL. 1990，Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*［J］. *Plant Cell*，*Tissue and Organ Culture*，**21**：61—66

Yang MZ，Jia SR，Pua EC. 1991，High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br.［J］，*Plant Cell*. *Tissue and Organ Culture*，**24**：79—82